

④Int.Cl.  
G 01 N 33/531  
C 12 N 15/00識別記号 序内整理号  
Z-7906-2G  
8412-4B

④公開 昭和63年(1988)5月18日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

発明の名称 DNAの分子量測定用標準マーク

④特 許 昭61-148891

④出 特 昭61(1988)6月25日

④発明者 石和 浩美 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社  
内

④発明者 烏原 春恵 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社  
内

④出願人 株式会社ヤクルト本社 東京都港区東新橋1丁目1番19号

④代理人 弁理士 尾崎 光三

## 明細書

標準マーク。

## 1. 発明の名称

DNAの分子量測定用標準マーク

## 2. 特許請求の範囲

(1) プラスミドpHT300PLKに対して唯一の制限酵素切削部位を有する制限酵素によって当該pHT300PLKを切削して得られる1,878bpのDNA断片と、当該pHT300PLKを制限酵素EcoRIによって切削して得られる2,016bp、1,388bp、838bp、406bp、297bp及び83bpの6種類のDNA断片と、当該pHT300PLK由来のプラスミドpHT300.2PLKを制限酵素EcoRIによって切削して得られる1,388、1,167、928、688、488、287及び83bpの7種類のDNA断片と、組合して成るDNAの分子量測定用標準マーク。

(2) プラスミドpHT300PLKに対して唯一の制限酵素切削部位を有する制限酵素が、EcoRIである特許請求の範囲第1項記載DNAの分子量測定用

## 3. 発明の詳細を説明

## &lt;産業上の利用分野&gt;

本発明は、アガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル電気泳動等によりDNAの分子量を測定する場合に適用されるDNAの分子量測定用標準マークにに関するものであり、更に詳しくは、高分子量領域から低分子量領域に亘る広い分子量領域にわたって、連続に分散分布した数個バンドをゲル上に明確に形成し得るDNAの分子量測定用標準マークに関するものである。

## &lt;従来の技術及びその問題点&gt;

従来、アガロースゲル電気泳動、アクリルアミドゲル電気泳動等に代表されるゲル電気泳動により、DNAの分子量を測定する場合にスタンダード(参照用標準)として使用される分子量測定用標準マーク(以下、分子量マークという)が、特々、開発されているが、実際には、DNAの分子

0452

用可能な分子量マークーは比較的少なく、一般に、低分子量領域で得られた分散分 特性を示す低分子量マークーと、高分子量領域で同様の 性を示す高分子量マークー等を、混定、混訣し、利用目的に応じて、各々組み わせて使用することが一般的な使用方法となっている。

現在、広く普及している分子量マークーとして、例えば、 $\text{M}_x \text{PITC}$  を酵母細胞壁<sup>11</sup> にて切削して作製されたものや、アラーヴィングDNA<sup>12</sup> を酵母細胞壁<sup>13</sup> にて切削して作成されたもの等があるが、前者は、低分子量領域において得られた分散分 特性を示すが、アガロースゲル電気泳動に用いると、電荷バンドが複数していて分別が不明瞭となる傾向があり、また、後者は、 $25\text{bp}$ 以上の高分子量領域で有用であるが、低分子量領域における分子量マークーとしては不適当である。

このように、組合する分子量領域に応じて、使用可能な分子量マークーが限られているために、実際に、組合を分子量マークーを混訣し、各々、

#### <問題点を解決するための手段>

すなわち、本発明は、アガロースゲル電気泳動等に適用可能で、より広い分子量領域において使用することのできるDNAの分子量測定用標準マークーを提供することを目的とするものである。

そして、この目的を達成するためには、使用される本発明の構成は、①プラスミドPDT300PLKに対して唯一の酵母細胞切削部を有する酵母細胞によって作成のPDT300PLKを切削して作製される $4,870\text{bp}$ のDNA断片と、②酵母細胞PDT300PLKによって作成のPDT300.2PLKを切削して作製される $2,016\text{bp}$ 、 $1,300\text{bp}$ 、 $880\text{bp}$ 、 $400\text{bp}$ 、 $200\text{bp}$ 及び $100\text{bp}$ の6種類のDNA断片と、③酵母細胞PDT300PLK由来のプラスミドPDT60から公知手段により作製される $1,000$ 、 $1,107$ 、 $916$ 、 $811$ 、 $517$ 及び $313\text{bp}$ の7種類のDNA断片とを組合して成るものである。

ここで、前述の既報のプラスミドPDT300PLKに対して唯一の酵母細胞切削部を有する酵母細胞としては、例えば、<sup>14</sup> 山田氏が特許に使用されう

るが少く、又に、カナロウの<sup>15</sup>山田氏とモリモト氏からも、より広い分子量領域にわたって適用可能な酵母分子量マークーがあれば、その適用範囲は大きなものである。その上、現実 多く 分子量マークーは、その製造工程において高成 效率と簡便をテキニッタが品質とされることから、生産コストが極めて高く、コスト面からも、より簡便性の高い製造技術を実現することが強く要請されており、本発明にあつた。

分子量マークーについてのこのよう問題点を検討すると共に、本発明者らは、より広い分子量領域において適用可能な分子量マークーを開発すべく組合研究開発を読み進めた結果、プラスミドPDT300PLK 及び当該PDT300PLK由来のPDT300.2PLK等、各々特定の酵母細胞により切削して得られるDNA断片の混合物が、このような分子量マークーとして評価であることを見い出して、本発明を完成するに至った。

#### 3.

由来材料として使用するプラスミドPDT300PLKは、公知・入手可能（該工事実審第746号として過度産業化工業技術院微生物工業技術研究所に登録）のものであり、大腸菌(*Escherichia coli*)由来のプラスミドPDT300PLKと、ストレプトコッカス・フルカリス(*Streptococcus faecalis*)由来のプラスミドPDT60を組合せて作製された複合プラスミドPDT60から公知手段により作製される（Jpn.J.Bacteriol. 1981, 238-243(1981) 参照）。

また、既報の記載のプラスミドPDT300.2PLKは、以下の工程により前述PDT300PLKから作製される。すなわち、プラスミドPDT300PLKを酵母細胞壁<sup>16</sup>及び<sup>17</sup>山田氏により切削して得られる2種類のDNA断片のうちの高分子量の断片と、前記複合プラスミドPDT60を酵母壁<sup>16</sup>及び<sup>17</sup>山田氏により切削して得られる2種類のDNA断片のうちの高分子量の断片とを組合してPDT300.2PLKを作製する工程を経て、次いで、当該PDT300.2PLKの壁<sup>18</sup>切削部に、

本社、商標 pET300.7PLE 作製は、既実、公知の手段により実現される (Jpn. J. Genet. 19, 418-420 (1984) 参照)。そして、この pET300.7PLE は、新規酵素活性による新規活性が、pET300 由来の BSA 蛋白中 (これを山<sup>1</sup>とする) と、pET300 PLE 由来の BSA 蛋白中 (これを山<sup>2</sup>とする) 2 处所に存在するが、こうも、山<sup>1</sup>新規活性に、山<sup>1</sup>リソシングカーポリ個体入されたものが、pET300.2PLE (4,607bp) である。

この pET300.2PLE は、山<sup>1</sup>リソシングカーポリにより、新たに山<sup>1</sup>新規活性及び山<sup>2</sup>新規活性が形成されると共に、山<sup>2</sup>新規活性を消失するが、テトラサイクリン遺伝子中の山<sup>1</sup>は喪失しているので、商標 pET300.2PLE による新規活性は、テトラサイクリン活性を示す。

pET300.2PLE の製作工程及び pET300.2PLE の酵母実験結果を、各々、第 2 図及び第 3 図に示す。

本発明の分子量マーカーの構成要素である pET300PLE 及び pET300.2PLE の各切片 A~I と、検出する分子量との関係を表 1 に示す。

アスカド 新規 活性 位置	（bp）		
	pET300PLE	pET300PLE	pET300.2PLE
	8164	8064	8044
A	4,870	—	—
B	—	2,618	—
C	—	1,300	1,300
D	—	—	1,107
E	—	—	920
F	—	656	656
G	—	400	400
H	—	207	207
I	—	60	60

され、これにより得られた BSA 蛋白を、過量の割合で混合することにより、目的の分子量マーカーが製作される。

そして、例えば、前記 1 及び前記の BSA 蛋白を、1:1:2:1:1 の割合で混合して、組した分子量マーカーを 1% アガロースゲル電気泳動により検査テストした結果 (第 4 図 A, レーン 2 参照) から確認されるように、本発明の分子量マーカーは、8000bp の高分子量領域から、80bp の低分子量領域にわたって、適度に分散分布した本の構造をバンドの形成が可能であるという実験結果にみられない驚異的な結果を有することが判明した。

また、BSA 蛋白作製のための由来材料としての pET300PLE 及び pET300.2PLE は、大腸菌 (E. coli) によるマルチコピーベクターとして、簡便を原理により、さわめて高效率の生産が可能であることがから、生産コストの面に關してもそのコスト削減効果は絶大である。

#### ＜実施例＞

以下に、実施例を記載して、更に、本発明について具体的に説明するが、本発明は、いうまでもなく実験実施例の範囲に限定されるものではない。

#### (1) pET300.7PLE の山<sup>1</sup>新規活性の創出 及山<sup>1</sup>リソシングカーポリの導入 (pET300.2PLE の作製)

8164 の pET300.7PLE BSA (100 μg / ml ) (J. Genet. 19, 418-420 (1984) 参照) に、5.7 μl の 10 倍濃度酵母液 (1 ml Tris-HCl (pH 7.0), 70mM EGTA, 70mM β-メルカプトエタノール, 100mM NaCl) を加えた後、Eco I (3.0 μl / ml ) を 2 ml 1 滴加し、37°C, 30 分間反応させた。37°C で 5 分間加熱することにより反応を停止させた後、1% 酢酸アガロースゲル (ヨウ素化剤、1 μl / ml エチジウムプロマイド含有) 電気泳動を行い、Eco I により 1 ヶ所が切開された分子量約 2.0 kDa のバンドを切り出した。

OH 8.0) )を加え、150℃の蒸餾中で沸かした後、室温までさまし、等量のフュノールを加えてよく混とうした。次に、室温で 15000rpm、3 分間の遠心分離処理を施した後、DNA を含む水層を採取し、再び等量 フュノールを加え、核酸処理を繰返し、DNA を含む水層を採取した。続いて、これに 200μl の緩衝液 (50mM Tris, 10mM EGTA, 100mM NaCl (pH 8.0) )を加え、更に全量の 2 倍量の -20℃ のメタノールを加え、-20℃、30 分間冷却した。これに 90℃、15000rpm、3 分間の遠心分離を施し、DNA 沈澱物を再び -20℃ メタノールで洗浄した後、再度、90℃、15000rpm、3 分間の遠心処理を施し、上層のエタノールを捨て、沈澱物中に残っているエタノールを完全に揮発させた。ここで、得られたDNAに、5ml の緩衝液を加えてDNAを溶解し、10倍濃度のT4 RNA リガーゼ緩衝液 (570mM Tris-EGTA (pH 8.0), 0.7 mM NaCl, 70mM 8-アーノカブトエタノール)

(E. coli K12 C600 種, Jpn. J. Genet. 52, 23-24 (1967) 参照) のコンビテント酵液を加え、90℃、10 分間加熱した後、0.7ml のL-プロスを加えて、37℃、1 時間培養した。続いて、この培養液をL-プロスに1.1 g のホスと20μl/s/ml のテトラサイクリンを添加して成るホス培地の表面に塗布して、37℃で一夜培養した。このホス培地上にコロニーを形成した12種の形質転換体について、保有プラスミドの大きさを調べた。

### (3) プラスミドの抽出と分子量の測定 (1)

#### 1. DNA 1 切削実験の実験

DE300, TPLC の上記 1 切削実験は、テトラサイクリン耐性を保有する中に施設していることから、実験 (1) 記載の実験で上記 1 切削実験を施設すると、テトラサイクリン感受性になるとことから、テトラサイクリンを添加したL-プロスホス培地地上では、形質転換体の生育は見られない。そこで、上記 1 切削実験が成るとしてテトラサイクリン耐性を保有する形質転換体からプラスミドを抽出し、新たに上記 1 切削実験が形成されたプラスミドを

5μl の T4 DNA リガーゼを 0.5 μl 加え、37℃で 15 分間、反応させた。更に、200 μl の 50mM Tris-EGTA (pH 8.0) - 10mM EGTA-1M NaCl を加えた後、フュノールを加えて静置を失活させた。次いで、前述のメタノール洗浄液よりDNAを回収した。

ここで、得られたDNAに 2.0μl の緩衝液を加えて溶解させ、DNA リンカー [4( pGCTTCGACG ) / 空型 ( 空 ) 種, 0.01-0.05/μl ] を 1μl 加え、3μl の 10mM ATP, 3μl の 100mM ヴチオヌクレオチード、3μl の 0.05mM Tris-EGTA (pH 7.0) - 50mM NaCl を加え、更に、3μl/μl の T4 RNA リガーゼを 1μl 加えた。15℃で 3 時間の反応を行わせた後、120 μl の緩衝液を加え全量を 150μl とした。

### (2) 大腸菌の形質転換

実験 (1) 記載の実験で得られたプラスミド DNA 150μl ( 約 0.8μg ) に、150μl の大腸菌

液を加えた。

その後も、実験 (2) 記載の実験で得られた形質転換体を 50μl の L-プロスで一夜培養後、遠心分離処理により集出し、2ml の 20mM Tris - 10mM EGTA (pH 8.0) に溶解し、0.2ml の 0.2mg/ml リソチーム - 0.05mg/ml RNase を加えて室温で 10 分間の反応を行った後、0.2ml の 0.2% SDS 混液を加え室温で 2 分間反応させ、0℃、10 分間放置後、この液量に 20,000rpm、0℃、10 分間の遠心分離処理を施した。分離された上層に緩衝液で洗浄したフュノールを少量加え、よく振とうした。更に、これを 15,000rpm、室温、3 分間の遠心分離処理を施し、DNA を含む水層を採取し、15μl づつ 0.2 g アガロースゲル電気泳動にかけて、その分子量を測定した。その結果、12種の形質転換体の保有するプラスミドは、全て約 3.072 であった。

次に、この 12 種の形質転換体の保有するプラスミドのうち、目的どうり上記 1 切削実験が形成されたものをさがすために、各菌に使用された菌の、DNA を含む水層からメタノール液により DNA

0.10M HCl(0.07.0) を用いて測定した。

このプラスミドDNA 10μl に、2種類の酸性物質(200M Tris-HCl(0.07.0), 100M NaCl, 100M バーナルカブトニクノール, 100M NaCl) を10μl ずつ加えた後、又に、12μl/μl のDNAを10μl ずつ加し、これを37℃で30分間反応させた。そして、70℃、5分間の加熱処理により、この反応を停止させ、重量を0.1%アガロースゲルで電気泳動させた。その結果、図1で示されたプラスミドDNA 10μl が1種類採取された。

続いて、この採取されたプラスミドDNA 10μl に2種類の酸性物質(200M Tris-HCl (0.07.0), 100M NaCl, 100M バーナルカブトニクノール, 100M NaCl) を10μl ずつ加え、それに0.1%のDNAのDNAと12μl/μl のDNAと12μl/μl のDNAを、各々10μl 単独又は組合せ加し、これを37℃、30分間反応させた後、70℃、5分間の加熱処理により、この反応を停止させ、重量を0.1%アガロースゲルで電気泳動させた。その結果、目的どおり、図1の結果

されたものである(第2回、第3回参照)。

#### (4) PET300.2PLE 及び PET300.2PLK の結果 混合による分子量マーカーの作用

既記(3)既報の場所で得られたPET300.2PLE を常法により図1とで切削して得られた2種の切削片(第4回A, レーン1)と、PET300PLK (JP. S. J. Const. 11, 238-242(1988)参照)を常法により、図1とで各々切削して得られた2種の切削片(第4回B, レーン2)及び1種の切削片(第4回B, レーン3)とを、各々、10:2:1の混合割合で混合して、目的の分子量マーカーを得た。

アガロースゲル(1%)電気泳動の吸収バンド(第4回A, レーン2のA~I)から明らかのように、本発明の分子量マーカーは、約0.0005Mの高分子量領域から0.05Mの低分子量領域にわたる広分子量領域に適度に分離分離したDNA切削片による吸収バンドを形成し得る優れた特性を有するものであることが確認された。

比較対象として、既報の分子量マーカーの中

のPET300.2PLE(0.07.0)を用いて測定した。

本報、同様の場所で、図1の切削片に図1のリンカーベーを挿入する際、図1のリンカーベーで挿入される場合と、複数個連結して挿入される場合を考えられる。假りに、図1のリンカーベーが2個挿入されていると、連結した2個の図1のリンカーベーの間に、新しい図1の切削片が形成されることになる。

PET300.2PLE の図1の切削片は、全部で2個あるが、PET300.2PLE のDNAを図1とで切削して得られたDNA切削片に関しては、その個数及び各々の分子量をアガロースゲル電気泳動により測定した結果、7個の切削片が確認された。このことは、新たに得られた図1の切削片に図1の切削片が形成されていることを意味するものである。すなわち、PET300.2PLE は、PET300.2PLK の図1の切削片に2個の図1のリンカーベーが挿入されたものであり、その結果、新たに図1の切削片が形成

されたものである(第2回、第3回参照)。

174BP の図1の切削片及びAファーリングの図1の切削片のアガロースゲル(1%)電気泳動による吸収バンドを参照してみると、0.1 174BP 分子量マーカーは、低分子量領域で優れているものの、アガロースゲル(1%)電気泳動では、バンドのA, B, C, D等が確認しているので、その分離が不明瞭且つ困難であり(第4回A, レーン1, A~I)。また、AファーリングDNA分子量マーカーは、高分子量領域にて既定的に有効なものである(第4回A, レーン3)ことからも、本発明の分子量マーカーは、その分離分離領域の広さという点で優れたものであることが明らかである。

更に、本発明の分子量マーカーの作用材料であるPET300PLK 及びPET300.2PLK は、大腸菌(1.611 E. coli 100 箱)を宿主として大量生産が容易であることから、生産コストの面でも優れて優れた効果を有することが確認された。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1回は、プラスミドPET300PLK の細胞内実地

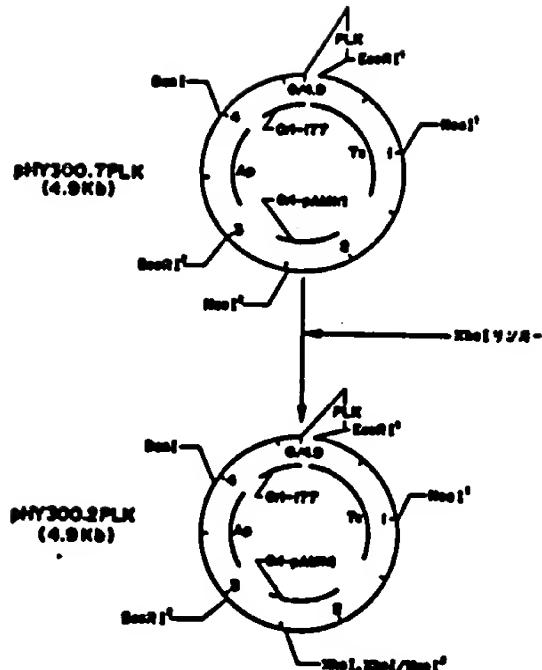
卷之十。

第三圖版、プラスミド、BY200.2PLK 銅質銀質  
地圖全圖。

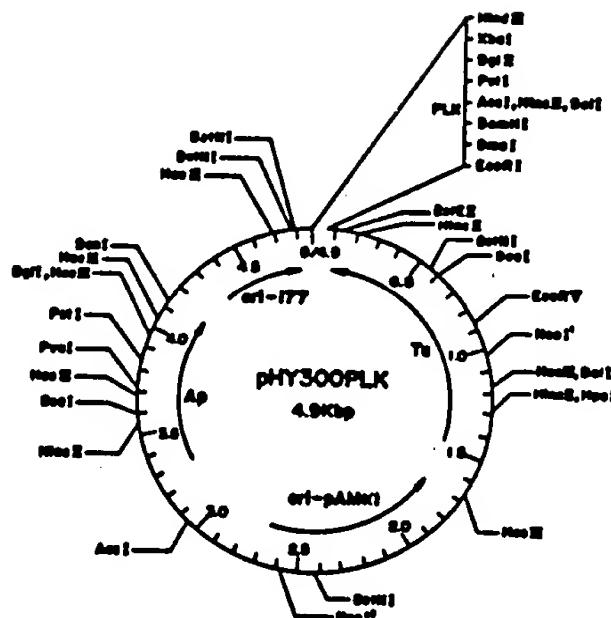
第4回は、アガロースゲル(1%)電気泳動による結果として、バンドを示す写真であり、両図のAにおいて、レーン1は、62-174EFの山<sup>1</sup> 切断片(s~t)を、レーン2は、本発明の分子量マーカー(A~I)を、レーン3は、アフターグリルの山<sup>2</sup> 切断片を、そして、両図Bにおいて、レーン1は、PET300.2PLXの山<sup>1</sup> 切断片を、レーン2は、PET300PLXの山<sup>1</sup> 切断片を、レーン3は、PET300PLXの山<sup>2</sup> 切断片を、各々示す。

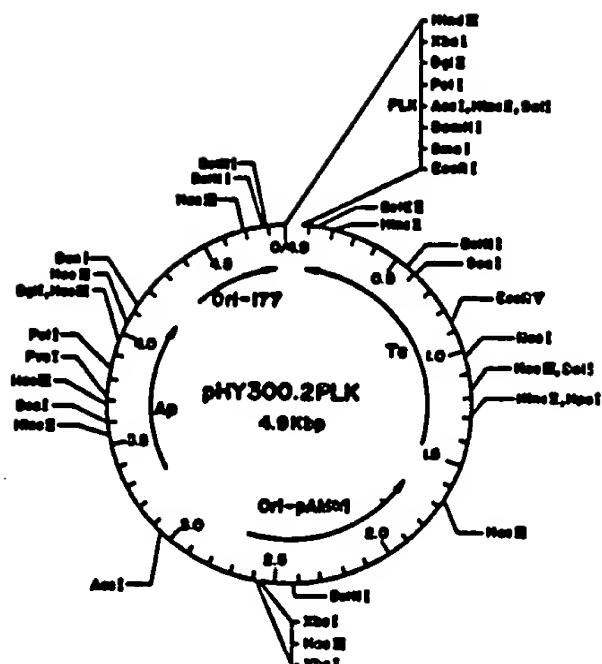
新日本書店　株式会社　ヤマケイ本舗

代理人 办理士 陈锦光 三



10





卷之三

手続補正書（方表）

卷之四

西游记

1. 事件の表示  
件頭番 61-148891号

2. 発明の名称 DNAの分子量測定用標準マークー

3. 紹正をする者  
事件との関係 特許出願人  
住 所 東京都渋谷区道玄坂1丁目1番19号  
(03) 株式会社 ヤカルト本社  
名 称 取締役社長 佐藤和也

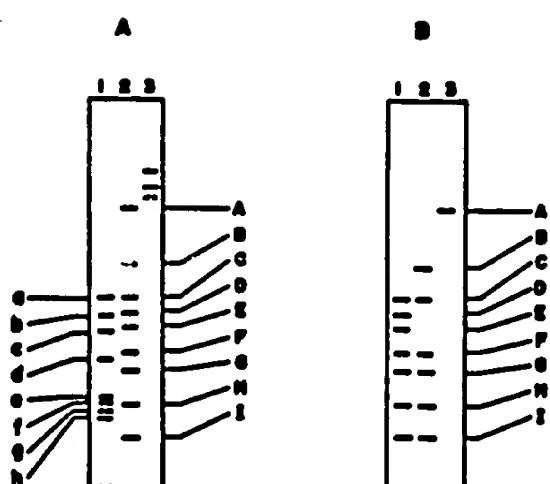
4. 代理人  
住 所 東京都渋谷区道玄坂1丁目20番2号  
オリンピタル道玄坂601  
氏名 弁理士 (03) 佐藤元 三

5. 紹正令の日付 昭和61年8月6日  
(昭和61年8月26日付発送)

6. 紹正により増加する発明の数 0

7. 紹正の対象 明細書の「測定の標準を説明」の欄

8. 紹正の内容 説明の追加



「よる検査結果として——写真であり、」を  
「よる検査結果としてのバンドを示す電子写真  
写真であり、」に修正する。

特許庁長官 小川邦次

## 1. 事件の表示

昭和61年 特許第 第148891号

## 2. 発明の名称

DNAの分子量測定用標準マークー

## 3. 修正をする者

事件との関係 特出願人  
住所 東京都渋谷区東渋谷1丁目1番1号  
(010) 株式会社 カカルト本社  
名前 取締役社長 一般 肉 己

## 4. 代理人

住所 東京都渋谷区道玄坂1丁目20番2号  
カリエンタル道玄坂602  
氏名 外理士 (010) 月崎光三

## 5. 修正命令の日付 昭和62年10月7日

(昭和62年10月27日付発送)

## 6. 修正により増加する発明の数 0

## 7. 修正の対象

明細書の「図面の簡単な説明」の欄  
及び図面(第4図)

## 8. 修正の内容

明細書の「図面の簡単な説明」の欄  
及び図面(第4図)  
別紙の通り

特許庁  
62.11.13  
H.M.

## 9. 修正の内容

(1) 明細書の「図面の簡単な説明」の欄の記載  
を以下のように修正する。

## (1) 第10頁第6行～同第7行

「第4図は——写真であり、」を  
「第4図は、アガロースゲル(1%)電気泳動  
による検査結果としてのバンドを電子写真した  
写真であり、」に修正する。